

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 1 1 月 1 1 日
Date of Application:

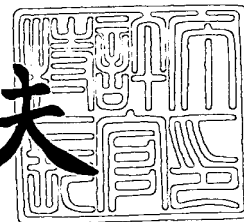
出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 3 2 7 0 6 5
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 2 - 3 2 7 0 6 5]

出 願 人 株 式 会 社 島 津 製 作 所
Applicant(s):

2 0 0 3 年 8 月 1 8 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 K1020401

【提出日】 平成14年11月11日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 27/26

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津
 製作所内

 【氏名】 中村 伸

【特許出願人】

 【識別番号】 000001993

 【氏名又は名称】 株式会社島津製作所

【代理人】

 【識別番号】 100085464

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 野口 繁雄

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 037017

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

 【包括委任状番号】 9110906

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 マイクロ流体デバイスとそれを用いた分析方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 基板内部に分離流路と、その分離流路から分岐した試料導入量規定流路を備え、前記分離流路の一端が前記基板面から突出する方向に延びてその先端の開口が試料導入部となり、前記分離流路の他端と前記試料導入量規定流路の先端にそれぞれ開閉機構を備え、前記試料導入量規定流路の容積が導入される試料量となっていることを特徴とするマイクロ流体デバイス。

【請求項 2】 前記試料導入部は前記基板の下面に設けられ、前記分離流路の他端と前記試料導入量規定流路の先端は前記基板の上面に開口をもち、それぞれの開口に前記開閉機構を備えている請求項 1 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 3】 前記開閉機構はバルブである請求項 1 又は 2 に記載のマイクロ流体デバイス。

【請求項 4】 請求項 1 から 3 のいずれかに記載のマイクロ流体デバイスに泳動バッファを注入し、前記開閉機構を作動させて前記試料導入部から前記試料導入量規定流路の容積に相当する量の試料を導入した後、前記試料導入部と前記分離流路の他端との間に電圧を印加して、導入した試料の電気泳動による分離分析を行なうことを特徴とする分析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、極微量の試料を高速かつ高分離で分析する電気泳動装置におけるマイクロ流体デバイスと、それを用いた電気泳動分析方法に関する。マイクロ流体デバイスを用いた電気泳動分析は、生化学、分子生物学、臨床、例えば DNA（デオキシリボ核酸）や蛋白質の解析分野などで利用されている。

【0002】

【従来の技術】

極微量の DNA や蛋白質などを分析する場合には、従来から電気泳動法が用いられており、その装置化技術の例としてキャピラリー電気泳動装置がある。キャ

ピラリー電気泳動装置は、内径が $100\mu\text{m}$ 以下のガラスキャピラリー内に泳動バッファを充填し、一端側に試料を導入した後、両端間に高電圧を印加して分析対象物をキャピラリー内で展開させるものである。キャピラリー内は容積に対して表面積が大きい、すなわち冷却効率が高いことから、高電圧の印加が可能となり、DNAなどの極微量試料を高速、かつ高分解能にて分析することができる。

【0003】

近年、取扱いが煩雑なガラスキャピラリーに代わって、分析の高速化、装置の小型化が期待できる形態として、2枚の基板を接合して形成されたマイクロ流体デバイス（電気泳動チップデバイス）が提案されている（非特許文献1，2参照。）。。

【0004】

そのマイクロ流体デバイスの例を図4に示す。一对の透明基板（一般にはガラス、石英ガラス、樹脂など）1，2からなり、一方の基板2の表面には、(B)に示すように互いに交差するサンプリング用のローディング流路4と分離流路5を形成し、他方の基板1には、(A)に示すようにローディング流路4及び分離流路5の両端に対応する位置にリザーバ3を貫通穴として設け、それらの基板1，2を(C)に示すように重ねて接合したものである。このような従来のマイクロ流体デバイスは、試料導入は互いに交差するローディング流路4と分離流路5とからなるクロスインジェクターデザインの流路を用いることを基本としている。

【0005】

このマイクロ流体デバイスを使用するときは、いずれかのリザーバ3から泳動バッファをローディング流路4及び分離流路5中に注入する。その後、ローディング流路4の一方の端のリザーバ3に試料を約 $1\sim 2\mu\text{l}$ （マイクロリットル）注入した後、各リザーバ3にそれぞれ電極を差し込むか、又は予め各リザーバ3に形成された電極を用いて、電気泳動的にローディング流路4に試料を均一にかつ交差部6で分離流路5側に広がらないようにピンチングなど電圧を複数箇所印加しながら所定の電圧を印加し、試料をローディング流路4と分離流路5の交差部6に導く。

【 0 0 0 6 】

次に、印加電圧を分離流路 5 に切り替え、かつローディング流路 4 にも交差部 6 から逆方向に試料が移動するよう電圧を印加して、交差部 6 の試料のみを分離流路 5 に導入し、電気泳動分離を行なう。分離流路 5 の適当な位置に検出器を配置しておくことにより、分離成分の検出を行なう。

【 0 0 0 7 】

【非特許文献 1】

D. J. Harrison et al., Science 261 (1993) pp. 895-897

【非特許文献 2】

Anal. Chim. Acta 283 (1993) pp. 361-366

【 0 0 0 8 】

【発明が解決しようとする課題】

上記のように、実際に分離流路 5 に導入され分離される試料は交差部 6 の試料のみであるので、その体積は数 p l ～数 1 0 0 p l (ピコリットル) であるにも拘わらず、マイクロ流体デバイスに注入する試料量は数 μ l は必要である。そのため、分析に寄与しない無駄な試料量が多いという問題がある。このようなマイクロ流体デバイスで分析する試料は高価であることが多く、分析に必要な試料量を低減することは、ランニングコストの大幅な低減に直結するものであることから、試料量の低減に対する要請が強い。

本発明は、試料を無駄に注入することを防ぐ構造をもったマイクロ流体デバイスを提供することを目的とするものである。

【 0 0 0 9 】

【課題を解決するための手段】

本発明のマイクロ流体デバイスは、基板内部に分離流路と、その分離流路から分岐した試料導入量規定流路を備え、分離流路の一端が基板面から突出する方向に延びてその先端の開口が試料導入部となり、分離流路の他端と試料導入量規定流路の先端にそれぞれ開閉機構を備え、試料導入量規定流路の容積が導入される試料量となっていることを特徴とするものである。

【 0 0 1 0 】

分離流路に導入すべき p l レベルの試料量を、試料導入量規定流路の容積により規定することにより、その規定された量の試料のみを試料導入部から分離流路に導入することができる。

【0011】

試料導入部は基板の下面に設けられ、分離流路の他端と試料導入量規定流路の先端は基板の上面に開口をもち、それぞれの開口に開閉機構を備えているようにすることが好ましい。

開閉機構の一例としてバルブを使用することができる。

【0012】

本発明の分析方法は、上記のマイクロ流体デバイスを使用し、そのマイクロ流体デバイスに泳動バッファを注入し、開閉機構を作動させて試料導入部から試料導入量規定流路の容積に相当する量の試料を導入した後、試料導入部と分離流路の他端との間に電圧を印加して、導入した試料の電気泳動による分離分析を行なうことを特徴とするものである。

【0013】

【発明の実施の形態】

図1に一実施例のマイクロ流体デバイスを示す。

ガラス、石英ガラス、樹脂などからなる一対の透明基板の一方に流路が形成され、両基板が接合されることによって、得られた接合基板 10 の内部に、分離流路 C s と、分離流路 C s から分岐した試料導入量規定流路 C d が形成されている。分離流路 C s は一端側（図では左側）で、接合基板 10 の下面側に開口をもち、その開口に通じる筒部材 12 が接合されることによって、分離流路 C s は接合基板 10 の下面側に延びている。筒部材 12 の先端が試料導入部 I n j となっている。

【0014】

分離流路 C s の他端は接合基板 10 の上面側に開口をもち、その開口に開閉機構としてバルブ V s が設けられている。分離流路 C s の他端側が検出部 D となり、試料導入量規定流路 C d はその検出部 D とバルブ V s の間の分離流路 C s から分岐して形成されている。試料導入量規定流路 C d の先端も接合基板 10 の上面

側に開口をもち、その開口にも開閉機構としてバルブ V_i が設けられている。

【0015】

接合基板 10 内の分離流路 C_s のサイズは、幅が $10 \sim 200 \mu\text{m}$ 、深さが $2 \sim 90 \mu\text{m}$ 、長さが $10 \sim 100 \text{mm}$ である。筒部材 12 は円筒状で、その穴の径は $500 \sim 5000 \mu\text{m}$ である。試料導入量規定流路 C_d の容積は、実際に分離流路 C_s に導入する試料量になるよう寸法デザインを設定してある。

バルブ V_i 、 V_s はダイヤフラムの構造をもっている。

【0016】

以下に、図 2 と図 3 により、この実施例のマイクロ流体デバイスを用いた分析方法を説明する。ただし、図 2 と図 3 ではマイクロ流体デバイスを簡略化して示している。

【0017】

まず、図 2 (A) に示されるように、バルブ V_i を閉じた状態でバルブ V_s を開け、泳動バッファをバルブ V_s のポートから注入する。この時、バルブ V_s 側から加圧送液してもよいし、試料導入部 I_{nj} から引圧で注入してもよい。バルブ V_i は閉じられた状態なので、流路 C_d には泳動バッファは導入されない。

【0018】

泳動バッファを分離流路 C_s に注入終了後、図 2 (B) に示されるように、バルブ V_s を閉じ、試料導入部 I_{nj} を試料 20 中に浸し、バルブ V_i を開ける。この時、流路 C_d に分離流路 C_s 中の泳動バッファが毛管現象により導入され、その結果、試料導入部 I_{nj} から分離流路 C_s に試料 20 が体積変化分導入される。もし、バルブ V_i が密なる構造であれば、バルブ V_i を開けたときの体積変化によっても分離流路 C_s 中の泳動バッファが流路 C_d に導入されうる。22 は分離流路 C_s に導入された試料である。

【0019】

試料導入後、図 3 に示されるように、バルブ V_i を再び閉じて、分離流路 C_s の両端部を泳動バッファに浸すために、試料導入部 I_{nj} を泳動バッファ 30 のリザーバに浸し、バルブ V_s を開ける。分離流路 C_s には泳動バッファが注入されているので、この状態で分離流路 C_s の両端部が泳動バッファに浸された状態

になる。次に、分離流路 C s の両端部の泳動バッファに電極を挿入し、高圧電源 3 2 から分離流路 C s の両端間に電圧を印加することにより、電気泳動分離を行なう。

【 0 0 2 0 】

分離ピークの検出は種々の方法で行なうことができる。例えば、検出位置 D における光学的な蛍光検出、U V（紫外線）吸収検出、化学発光検出、作用電極と検出電極を設けた電気化学検出、あるいは分離流路 C s 末端からエレクトロスプレー法によりイオン化して質量分析計で検出するなどの方法がある。

【 0 0 2 1 】

分析終了後、バルブ V i , V s を開け、流路 C d 端部から加圧により泳動バッファのフラッシュによる除去を行なう。洗浄が必要な場合は、泳動バッファ注入と同じ手順で行い、同じくすべての流路のフラッシュを行なう。

【 0 0 2 2 】

【発明の効果】

本発明のマイクロ流体デバイスは、分離流路から分岐した試料導入量規定流路を備え、試料導入量規定流路の容積が導入される試料量となっているので、分離に必要な極微量の試料を試料導入量規定流路の容積により規定して分離流路末端部位に直接導入できる。この際、複雑な電圧の印加や、吸引あるいは加圧ポンプを必要としない。試料導入方法は、密閉空間の体積変化を利用するため、非常に簡単である。

また、電気泳動を用いないため、試料のイオン強度やイオン性夾雑物の影響を受けない。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

一実施例のマイクロ流体デバイスを示す概略斜視図である。

【図 2】

同実施例のマイクロ流体デバイスにおける試料導入方法を示す概略平面図であり、（A）は泳動バッファ注入工程、（B）は試料導入工程をそれぞれ示している。

【図 3】

同実施例のマイクロ流体デバイスにおける電気泳動分離工程を示す概略平面図である。

【図 4】

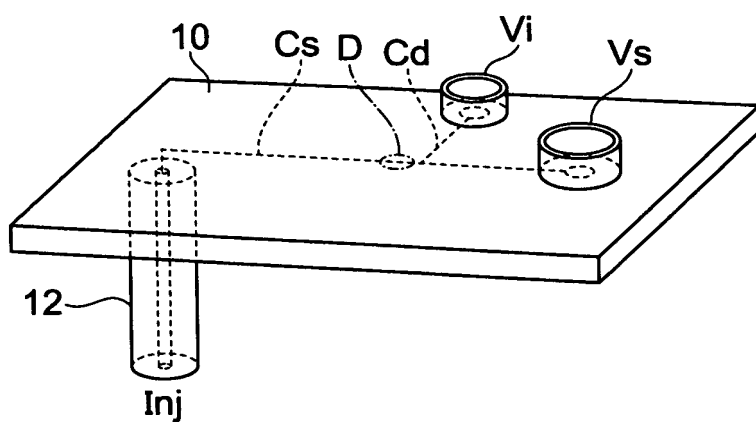
従来のマイクロ流体デバイスを示す図であり、(A)は一方の基板の平面図、(B)は他方の基板の平面図、(C)は両基板を重ねて接合した状態での側面図である。

【符号の説明】

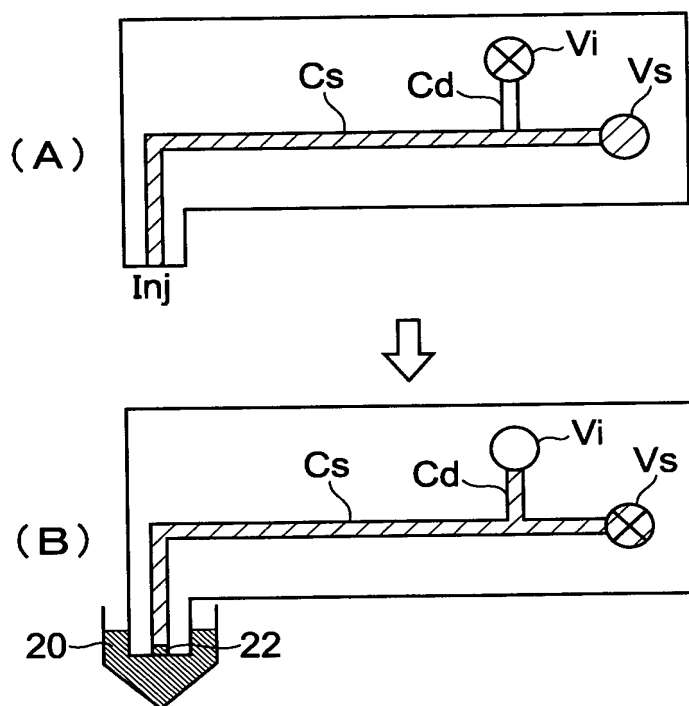
| | |
|--------|-----------|
| 10 | 接合基板 |
| 12 | 筒部材 |
| 20 | 試料 |
| 22 | 導入された試料 |
| 30 | 泳動バッファ |
| 32 | 高圧電源 |
| Cs | 分離流路 |
| Cd | 試料導入量規定流路 |
| Inj | 試料導入部 |
| Vs, Vi | バルブ |
| D | 検出部 |

【書類名】 図面

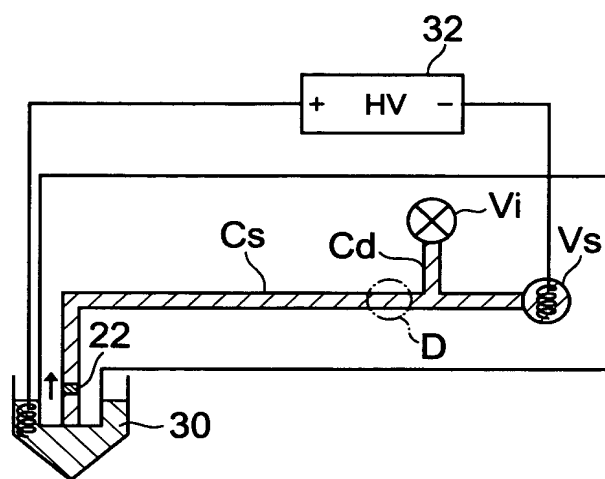
【図 1】



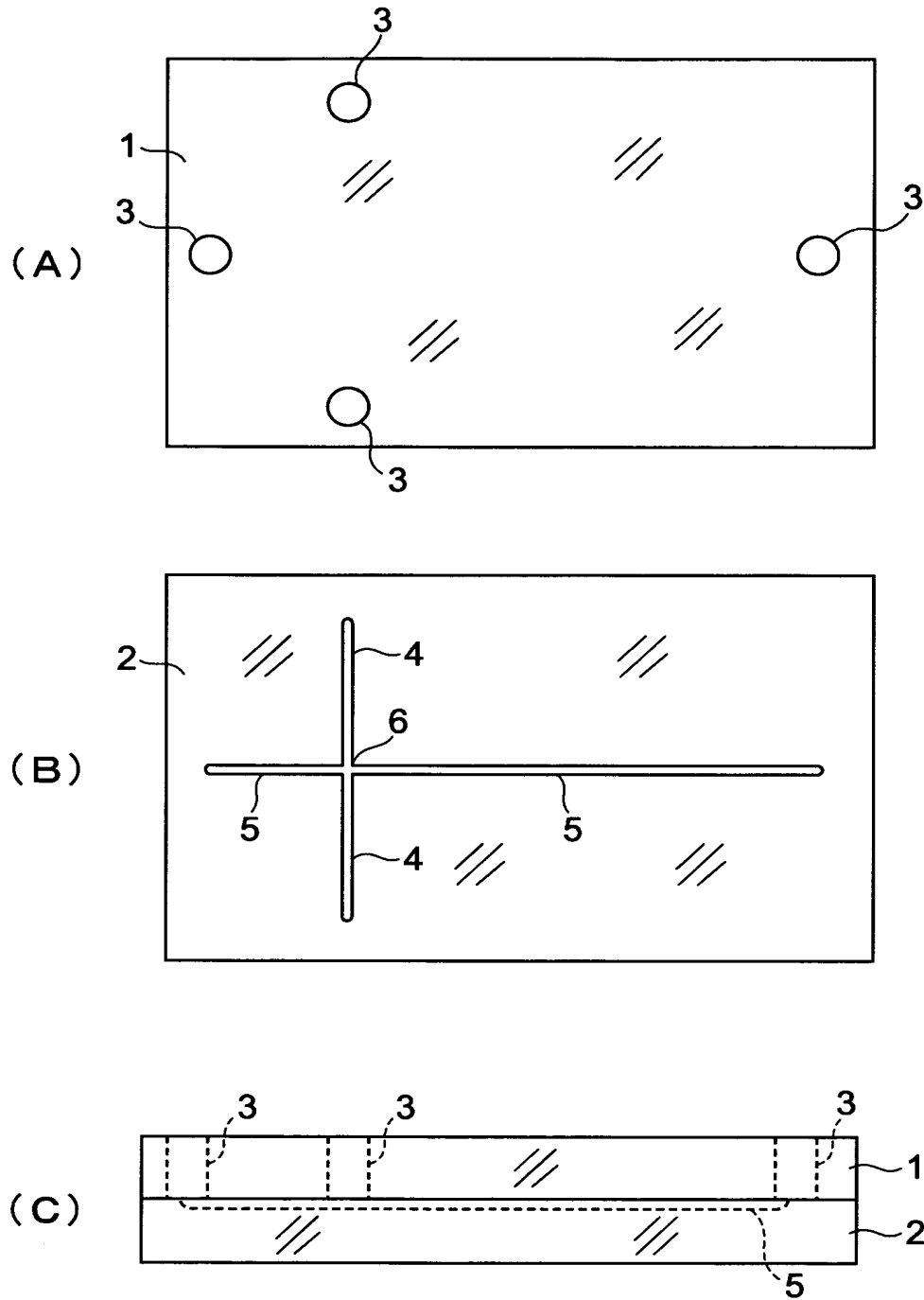
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 試料を無駄に注入することを防ぐ。

【解決手段】 基板 10 の内部に分離流路 C s と、分離流路 C s から分岐した試料導入量規定流路 C d が形成されている。分離流路 C s は一端側で基板 10 の下面側に開口をもち、その開口に通じる筒部材 12 が接合され、筒部材 12 の先端が試料導入部 I n j となっている。分離流路 C s の他端と試料導入量規定流路 C d の先端は接合基板 10 の上面側に開口をもち、それぞれの開口にバルブ V s , V i が設けられている。泳動バッファを分離流路 C s に注入終了後、バルブ V s を閉じ、試料導入部 I n j を試料 20 中に浸し、バルブ V i を開けると、流路 C d に分離流路 C s 中の泳動バッファが体積変化により導入され、試料導入部 I n j から分離流路 C s に試料 20 が体積変化分導入される。

【選択図】 図 1

特願 2 0 0 2 - 3 2 7 0 6 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 1 9 9 3]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地

氏 名

株式会社島津製作所

2. 変更年月日

2 0 0 3 年 5 月 1 6 日

[変更理由]

名称変更

住所変更

住 所

京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地

氏 名

株式会社島津製作所